

# Biosynthese des Cysteins in Mikroorganismen

(Assimilation des anorganischen Schwefels)

Klaus Schloßmann



# BIOSYNTHESE DES CYSTEINS IN MIKROORGANISMEN

(Assimilation des anorganischen Schwefels)

Auszug aus der  
Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
zu München

vorgelegt

von

Klaus Schloßmann

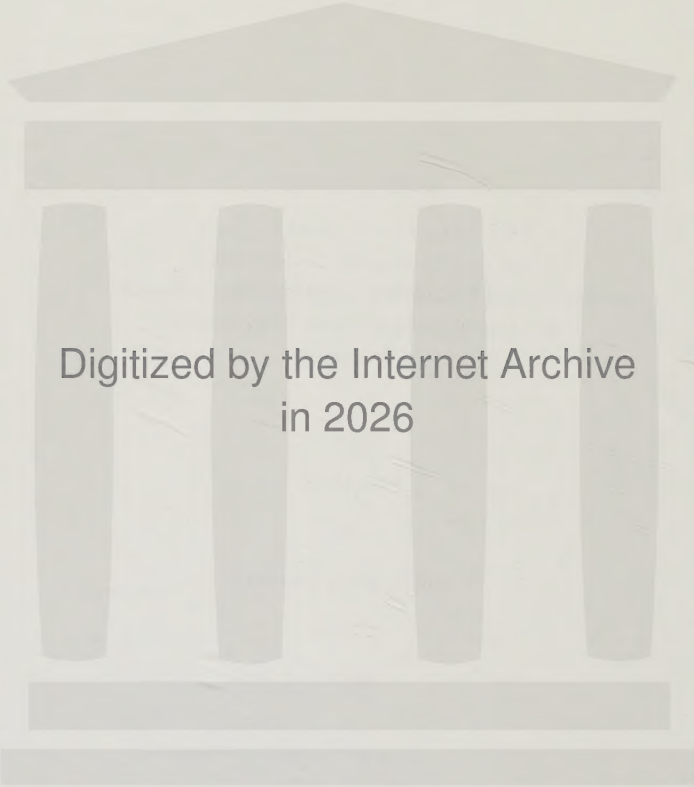
aus

Kiel

Mai 1957



Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1957  
Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## Biosynthese des Cysteins aus Serin und Schwefelwasserstoff

Vorläufige Mitteilung

Von

KLAUS SCHLOSSMANN\* und FEODOR LYNEN

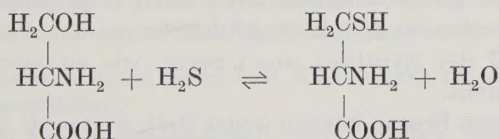
Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München  
und Max-Planck-Institut für Zellechemie, München

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 27. Februar 1957)

Organische Verbindungen des Schwefels sind in der lebendigen Substanz weit verbreitet. In Form von Sulfhydrylverbindungen erfüllen sie im Intermediärstoffwechsel, als Bestandteil von Enzymproteinen oder von Coenzymen (Coenzym A, Liponsäure, Glutathion), überaus wichtige Funktionen. Als anorganische Quelle des Schwefels für den Aufbau der organischen Verbindungen dienen die Sulfate. Sie werden von grünen Pflanzen und Mikroorganismen assimiliert und bei der Biosynthese der verschiedensten Thioverbindungen verwertet. Durch Markierung mit Isotopen [8] und durch Anwendung der biochemisch-genetischen Methode [4, 5] hat sich zeigen lassen, daß der Sulfatschwefel auf reduktivem Wege assimiliert und über die Aminosäure Cystein eingebaut wird; der chemische Mechanismus dieses Vorgangs war aber bisher nicht genau bekannt.

Wir konnten nun in Hefezellen ein Enzym nachweisen, das gemäß nachstehender Gleichung L-Serin und Schwefelwasserstoff zu Cystein vereinigt:



Zur Isolierung des neuen Enzyms werden Hefezellen durch hochtouriges Schütteln mit Glasperlen zertrümmert; der erhaltene zellfreie Extrakt wird durch Zugabe einer 2%igen Protaminsulfatlösung im Überschuß von unwirksamen Begleitstoffen befreit und das aktive Protein mit Ammonsulfat zwischen 40—65% Sättigung ausgesalzen. Durch Adsorption an  $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel bei  $\text{pH}$  5,7 und nachfolgende Elution mit  $m/10$  Trispuffer,  $\text{pH}$  8,0 erhält man eine Enzymfraktion, die gegenüber dem Rohextrakt eine rund 50fach höhere Aktivität zeigt.

\* Dissertation, Universität München 1957.

Die durch das Enzym katalysierte Cysteinsynthese benötigt Pyridoxal-phosphat<sup>1</sup> als Coenzym. Das gereinigte Protein, das bei  $-15^{\circ}$  mehrere Monate lang stabil bleibt, ist ohne Coenzymzusatz nahezu wirkungslos (Abb. 1).

Die experimentellen Befunde, auf die sich die chemische Reaktionsgleichung für die Cysteinbildung stützt, sind die folgenden:

1. Bei der Inkubation von Serin mit überschüssigem  $\text{H}_2\text{S}$ , Pyridoxal-phosphat und Enzym entsteht die dem eingesetzten L-Serin stöchiometrisch entsprechende Menge Cystein. Die im racemischen Serin ent-

haltene D-Komponente beteiligt sich nicht am Umsatz (Tab. 1 a).

2. Der Verbrauch von L-Serin ist an die Gegenwart des Schwefelwasserstoffs gebunden. Nach der Inkubation des Enzyms ohne Schwefelwasserstoff findet man das zugesetzte Serin quantitativ wieder (Tab. 1 b).

3. Versuche mit radioaktivem  $\text{H}_2^{35}\text{S}$  führten zu radioaktivem Cystein, das nach Überführung in die Cysteinsäure (mittels Perameisen-

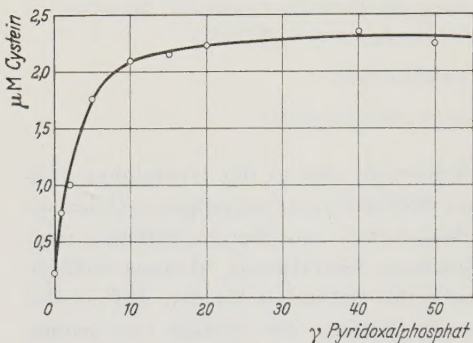


Abb. 1. Pyridoxal-phosphat-Bedarf.

0,25 m Trishydroxymethyl-aminomethan-Puffer, pH 8,0, enthaltend  $17,2 \mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $13 \mu\text{M}$  D,L-Serin,  $4 \mu\text{M}$  Äthylendiamin-tetraacetat und  $0,25 \text{ mg}$  gereinigtes Enzymprotein. Volumen:  $0,65 \text{ ml}$ ; Temp.  $37^{\circ}$ ; Inkubationszeit 2 Stunden

säure) papierchromatographisch und durch Hochspannungselektrophorese einwandfrei identifiziert wurde.

4. Aus  $\beta\text{-}^{14}\text{C}$ -Serin<sup>2</sup> und  $\text{H}_2\text{S}$  wurde ebenfalls ein radioaktives Cystein erhalten.

Versuche, das gebildete radioaktive Cystein in präparativem Maßstab zu isolieren, werden zur Zeit durchgeführt. Sie werden Aufschluß darüber geben, ob bei der Synthese aus L-Serin, wie zu vermuten ist, nur L-Cystein entsteht.

Am gereinigten Enzym können weder Glykokoll noch Alanin das Serin ersetzen; auch mit Threonin entsteht keine Sulfhydrylverbindung. Besondere Bedeutung kommt unseres Erachtens auch dem Befund zu, daß weder mit Thiosulfat noch mit Sulfit an Stelle des Schwefelwasserstoffs

<sup>1</sup> Wir danken der Firma Hoffmann-La Roche AG. für die Überlassung von Pyridoxal-phosphat.

<sup>2</sup> Für die Überlassung des radioaktiven D,L-Serins sind wir Dr. WARWICK SAKAMI, Western Reserve University, Cleveland, Ohio, zu sehr großem Dank verpflichtet.

Cystein entsteht. Der Einbau des anorganischen Schwefels zum Cystein erfolgt also erst auf der Stufe des Schwefelwasserstoffs und nicht bereits auf der Stufe der schwefligen Säure oder der Thioschwefelsäure, wie verschiedentlich [8, 4, 10] angenommen wurde.

Das neue Enzym, das als *Serinsulphydrase* zu bezeichnen wäre [9], konnte bisher in Bäckerhefe und in *Aspergillus niger* nachgewiesen werden. Auf Grund der Untersuchungen in den Arbeitskreisen um LAMPEN [5] und COWIE [8] darf man aber vermuten, daß die Umsetzung von Schwefelwasserstoff mit Serin auch noch bei anderen, zur Sulfatverwertung befähigten Mikroorganismen anzutreffen ist.

Tabelle 1

Die Reaktionsansätze bestanden aus 0,15 m Trishydroxymethyl-aminomethan-Puffer,  $pH$  8,0, enthaltend 4  $\mu M$  Äthylendiamintetraacetat, 25  $\gamma$  Pyridoxalphosphat und 0,25 mg (Versuchsreihe a) bzw. 1,0 mg (Versuchsreihe b) Enzymprotein; übrige Zusätze vgl. Tabelle. Vol. 0,65 ml; Temp. 37°; Inkubationszeit 3 Std

|    | Eingesetzt         |                    |                    | Gefunden               |                      |
|----|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|----------------------|
|    | L-Serin<br>$\mu M$ | D-Serin<br>$\mu M$ | $Na_2S$<br>$\mu M$ | Cystein [3]<br>$\mu M$ | Serin [7]<br>$\mu M$ |
| a) | 2,6                | —                  | 17,2               | 2,1                    |                      |
|    | 1,3                | 1,3                | 17,2               | 1,1                    |                      |
|    | 1,3                | —                  | 17,2               | 1,2                    |                      |
| b) | 10,5               | —                  | 17,2               | 6,8                    | 3,0                  |
|    | 5,25               | 5,25               | 17,2               | 3,2                    | 6,7                  |
|    | 10,5               | —                  | —                  | —                      | 10,0                 |

Die Biosynthese des Cysteins aus Serin und  $H_2S$  fügt sich den von METZLER, IKAWA und SNELL [6] sowie BRAUNSTEIN u. SCHEMJAKIN [2] entwickelten Theorien über die Pyridoxalkatalyse zwanglos ein. Sie ist somit den Biosynthesen des Tryptophans [11, 12] aus Serin und Indol oder des Cystathionins [1] aus Serin und Homocystein an die Seite zu stellen, wie dies von BRAUNSTEIN [2] vorausgesagt wurde.

KLAUS SCHLOSSMANN dankt Herrn Prof. BRÜGGEMANN für die ihm gewährte wohlwollende Unterstützung.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, danken wir für die Gewährung von Beihilfen.

### Literatur

- [1] BINKLEY, F., G. M. CHRISTENSEN and W. N. JENSEN: J. of Biol. Chem. **194**, 109 (1952). — [2] BRAUNSTEIN, A. J., u. M. M. SCHEMJAKIN: Zur Biochemie des Eiweißes, S. 162. Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften 1956. — [3] Dr. H. HILZ verdanken wir den Vorschlag, Cystein nach R. R. GRUNERT u. P. H. PHILLIPS [Arch. of Biochem. a. Biophysics **30**, 217 (1951)] zu bestimmen. Das

im Ansatz verbliebene  $H_2S$  wurde nach dem Abstoppen des Versuchs mit Metaphosphorsäure durch einen  $CO_2$ -Strom ausgetrieben. — [4] HOROWITZ, N. H.: J. of Biol. Chem. **171**, 255 (1947). — [5] LAMPEN, J. O., R. R. ROEPKE and M. J. JONES: Arch. of Biochem. a. Biophysics **13**, 55 (1947). — [6] METZLER, D. E., M. IKAWA and E. E. SNELL: J. Amer. Chem. Soc. **76**, 648 (1954). — [7] Papierchromatographisch bestimmt nach der modifizierten Methode von J. BRÜGGEMANN u. K. DREPPER: Naturwiss. **39**, 301 (1952). — [8] ROBERTS, R. B., P. H. ABELSON, D. B. COWIE, E. T. BOLTON and R. J. BRITTEN: „Studies of Biosynthesis in Escherichia Coli“, Carnegie Institution of Washington, D.C. 1955. — [9] SCHLOSSMANN, K., u. F. LYNEN: Angew. Chem. **69**, 179 (1957). — [10] SHEPHERD, C. J.: J. Gen. Microbiol. **15**, 29 (1956). — [11] UMBREIT, W. W., W. A. WOOD and I. C. GUNSALUS: J. of Biol. Chem. **165**, 731 (1946). — [12] YANOFSKY, C.: J. of Biol. Chem. **194**, 279 (1952).

Prof. Dr. F. LYNEN, München 23, Institut für Zellchemie, Kraepelinstraße 2

## Lebenslauf

Am 14. September 1922 wurde ich als Sohn des Amtsgerichtsrats Walter Schloßmann und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Marmetschke in Kiel geboren.

Nach 4jähriger Grundschulzeit besuchte ich das Reformgymnasium, später Deutsche Oberschule, in Neumünster. Nach Unterbrechung der Ausbildung durch Wehrdienst und Kriegsgefangenschaft von 1940 bis Januar 1948, legte ich im Mai 1948 die Reifeprüfung an der Internatsoberschule Plön ab.

Das Chemiestudium begann ich im Wintersemester 1948/49 an der Christian-Albrechtsuniversität Kiel, wo ich mich im November 1951 der Diplomchemikervorprüfung unterzog. Von Frühjahr bis Herbst 1953 führte ich unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Grewe, Direktor des organischen Instituts der Universität Kiel, die Diplomarbeit mit dem Thema "Über die Racemisierung der Chinasäure" aus und legte im Januar 1954 das Diplomhauptexamen ab.

Seit Februar 1954 arbeitete ich an dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München und begann im Juli 1954 mit der vorliegenden Dissertation.





